

Inhibitor of the activity of plasma C1-esterase (C1-inhibitor) and of other proteolytic enzymes of the serine protease group, process for preparing it, nucleic acids encoding this inhibitor, methods for detecting diseases linked to deficiencies in the said inhibitor using antibodies or nucleotide probes and medicinal products containing the said synthetic inhibitor

Publication number: FR2601034
Publication date: 1988-01-08
Inventor: TOSI MARIO; DUPONCHEL CHRISTIANE; MEO TOMMASO
Applicant: PASTEUR INSTITUT (FR); INST NAT SANTE RECH MED (FR)
Classification:
- **international:** **C07K14/81; A61K38/00; C07K14/81; A61K38/00; (IPC1-7): C12N15/00; A61K37/64; C07H21/04; C07K13/00; C12P19/34; C12P21/02**
- **European:** C07K14/81B1B
Application number: FR19860009662 19860703
Priority number(s): FR19860009662 19860703

Report a data error here

Abstract of FR2601034

C1-INH inhibitor, or fragments thereof, prepared using a process for the construction of bacterial or recombinant clones, or of recombinant eucaryotic cells containing a cDNA which encodes human C1-INH. Process for the construction of the said clones or cells. Application especially to the detection and to the treatment of diseases linked to deficiencies in the said inhibitor and in particular of hereditary angioneurotic oedema.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 254

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 601 034**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **86 09662**

⑤1 Int Cl⁴ : C 12 N 15/00; A 61 K 37/84; C 07 H 21/04;
C 07 K 13/00; C 12 P 19/34, 21/02.

⑫ **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②2 Date de dépôt : 3 juillet 1986.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 1 du 8 janvier 1988.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Fondation reconnue d'utilité publique :
INSTITUT PASTEUR et Etablissement public dit : INSTI-
TUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE
MEDICALE - INSERM. — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : Mario Tosi, Christiane Duponchel et Tom-
maso Meo.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : Cabinet Ores.

⑤4 Inhibiteur de l'activité de la C1-estérase plasmatique (C1-inhibiteur) et d'autres enzymes protéolytiques du groupe des protéases à serine, son procédé de préparation, acides nucléiques codant pour cet inhibiteur, méthodes de détection d'affections corrélées aux défauts dudit inhibiteur à l'aide d'anticorps ou de sondes nucléotidiques et médicaments contenant ledit inhibiteur de synthèse.

⑤7 Inhibiteur C1-INH, ou fragments de celui-ci, préparé en utilisant un procédé de construction de clones bactériens ou recombinants, ou de cellules eucaryotes recombinantes contenant un ADNc codant pour le C1-INH humain.

Procédé de construction desdits clones ou cellules.

Application notamment à la détection et au traitement d'affections corrélées aux défauts dudit inhibiteur et en particulier de l'angioedème héréditaire.

6 129 1728

FR 2 601 034 - A1

- 1 -

La présente invention est relative à un inhibiteur de l'activité de la C1-estérase plasmatique et d'autres enzymes protéolytiques du groupe des protéases à sérine, à son procédé de préparation, à des acides nucléiques codant pour cet inhibiteur, à des méthodes de détection d'affections, 5 corrélées aux défauts dudit inhibiteur, à l'aide d'anticorps ou de sondes nucléotidiques et à des médicaments contenant ledit inhibiteur de synthèse.

Les différentes classes des inhibiteurs de protéases 10 représentent une fraction importante des protéines du plasma et ils jouent des rôles déterminants dans le contrôle spécifique des différents processus protéolytiques. Les mieux étudiés de ces inhibiteurs sont les inhibiteurs des sérines-protéases tels que l'inhibiteur d' α_1 -protéase (α_1 -PI ou 15 α_1 -antitrypsine). Des comparaisons des séquences protéiques ont conduit à la constatation que l'ovalbumine et l'angiotensinogène présentent, de même que d'autres inhibiteurs de sérines-protéases que le α_1 -PI, des similitudes des structures primaires avec ce dernier, et que toutes ces protéines 20 appartiennent à une même famille fonctionnellement diversifiée, à laquelle a été attribué le nom de famille des Serpines (Serine Protéinase Inhibitors) par CARRELL et TRAVIS (TIBS, 10, (1985) 20-24).

Comme on le sait, le C1-inhibiteur ou C1-INH est 25 une glycoprotéine à chaîne unique dont le PM est d'environ 100000 et qui contient 35% d'hydrates de carbone. Le C1-INH a été identifié à l'origine comme étant un inhibiteur de la forme activée du premier composant du complément sérique C1, à savoir le complexe ($C1q + (C1r)_2 + (C1s)_2$). Il est le seul 30 inhibiteur plasmatique connu du C1r et du C1s, qui sont les sous-composants enzymatiques du C1. Ce C1-INH inhibe également la kallikréine du plasma, les facteurs XIIa et XIIa et la plasmine. De plus, le C1-INH réagit avec les formes non activées du C1r et du C1s, empêchant ainsi l'activation spon- 35 tanée du C1.

- 2 -

Certains Auteurs ont cherché à déterminer au moins en partie la séquence du site réactif du C1-INH humain. Cependant les informations fragmentaires dont on dispose jusqu'à présent sur la séquence en question, ne font apparaître qu'une communauté structurale entre le C1-INH et les serpins typiques (α_1 -PI, α_1 Achy, AT III, ovalbumine, angiotensinogène) limitée à l'emplacement du site réactif dans la partie carboxyterminale de la molécule (cf. SALVESEN et Al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 260, N° 4, 25 Février 1985, p. 2432-2436); de plus, les 40 résidus aminoterminaux du C1-INH humain décrits par HARRISON (BIOCHEMISTRY, 22, 1983, p. 5001-5007) ne présentent pas d'homologie séquentielle significative avec les serpins connues.

Or, il est d'une importance déterminante de pouvoir identifier la séquence du C1-INH et ses liens avec les autres - ou d'autres - serpins : en effet, comme on le sait, des taux insuffisants de C1-INH fonctionnel dans le sérum humain sont à l'origine d'une affection héréditaire grave, transmise comme caractère autosomal dominant, l'angioedème héréditaire (HAE). Cette affection se traduit par des crises paroxystiques d'oedème localisé qui sont particulièrement graves lorsqu'elles affectent les muqueuses gastro-intestinales et les muqueuses des voies respiratoires aériennes supérieures. Les crises qui atteignent le larynx comportent un taux de mortalité élevé par asphyxie.

On a introduit avec succès des traitements prophylactiques de l'HAE à l'aide d'agents hormonaux (androgènes à faible pouvoir virilisant) et d'agents antifibrinolytiques (acide tranexamique). Cependant les traitements hormonaux sont mal tolérés par les femmes et contre-indiqués chez les femmes enceintes et les enfants en cours de croissance, etc De plus, les agents androgéniques et les agents antifibrinolytiques sont peu efficaces lorsque la crise a déjà commencé.

Il a donc été proposé de remplacer les traitements

- 3 -

hormonaux et antifibrinolytiques par un traitement constitué par une préparation de C1-INH partiellement purifiée obtenue à partir de plasma humain (cf. GADEK et Al. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, Vol. 302, N° 10, 6 Mars 1980, p. 542-546). Or si les préparations de C1-INH constituent le traitement de choix de ce type d'affection, les quantités de C1-INH d'origine plasmatique humaine susceptibles d'être collectées sont nécessairement limitées et, surtout, leur fiabilité dépend de la qualité du contrôle visant à exclure toute contamination virale.

Il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'autres sources de C1-INH à la fois pour permettre une meilleure compréhension des propriétés fonctionnelles du C1-INH et pour disposer d'une source d'agent thérapeutique constante et sans aléas.

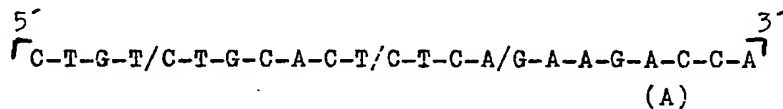
C'est pour atteindre les buts ainsi définis que les Inventeurs se sont tournés, pour acquérir une meilleure compréhension des propriétés fonctionnelles de la protéine qui constitue le C1-INH et pour développer une source alternative de C1-INH en tant qu'agent prophylactique et thérapeutique du HAE, vers la production des peptides du C1-INH par génie génétique. Une autre application commerciale d'une source alternative de C1-inhibiteur serait dans le domaine du dosage immunochimique de cette protéine dans le sérum humain. Ce dosage fait partie de la routine du diagnostic de l'angioedème soit héréditaire, soit acquis. Le C1-inhibiteur préparé à plus grande échelle et sans contamination possible due à d'autres protéines plasmatiques pourrait être utilisé dans le dosage immunochimique par compétition et d'autre part faciliterait la production d'anticorps spécifiques à utiliser dans le dosage direct.

La présente invention a pour objet le C1-inhibiteur ou des fragments de celui-ci préparés en utilisant un procédé de construction de clones bactériens recombinants ou de cellules eucaryotes recombinantes contenant un ADN complémen-

- 4 -

taire "ADNc" codant pour le C1-INH humain. Conformément à l'invention, ledit procédé de construction de clones est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : - une première étape qui consiste à extraire l'ARN total de fragments de foie humain prélevé post-mortem; - une deuxième étape qui consiste à isoler l'ARN polyadénylé, par chromatographie sur du Poly(U)-Sephadex, suivie d'élution à 42°C par du formamide à 50%; - une troisième étape qui consiste à dénaturer l'ARN polyadénylé, par de l'hydroxyde de méthyl-mercure et à le fractionner par sédimentation par un gradient isocinétique de saccharose de 10 à 33% poids/volume; - une quatrième étape qui consiste à identifier les fractions d'ARN qui sont enrichies en messagers codant pour le C1-INH; - une cinquième étape qui consiste à synthétiser de l'ADNc double-brin à partir d'une fraction d'ARN enrichie en ARN messagers codant pour le C1-INH, en rendant une extrémité de l'ADNc homopolymère et en l'intégrant dans le vecteur pUC9 à extrémité poly(dG), puis en introduisant les plasmides recombinants formés, dans des bactéries *E. coli* compétentes; - une sixième étape qui consiste à cribler les bactéries qui possèdent l'information génétique nécessaire à la production du C1-INH et à isoler les clones d'ADNc qui codent pour le C1-INH humain.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé de préparation de clones d'ADNc codant pour le C1-INH, le criblage des clones recombinants a été réalisé à l'aide d'un mélange marqué de huit icosamères synthétiques couvrant les acides LNFVQQ, qui sont une partie du peptide séquencé et positionné par SALVESEN et Al. (Loc. cité) au site réactif, à proximité de l'extrémité carboxyle de la protéine, lesquels icosamères synthétiques sont constitués par des oligonucléotides de formule A ci-après :



- 5 -

qui constitue une sonde moléculaire synthétique pour le C1-INH humain et d'autres mammifères.

La présente invention a, en outre, pour objet la séquence en nucléotides codant pour tout ou partie du C1-inhibiteur, les ADN recombinants et les clones contenant lesdits ADN, obtenus par le procédé mis en oeuvre. Les clones codent pour au moins une partie de l'inhibiteur C1-INH humain ou d'une protéine très voisine de ce dernier par sa structure primaire ou son activité biologique.

L'invention couvre également tant la séquence nucléotidique et en acides aminés complète du C1-inhibiteur que les fragments de celui-ci caractérisés par les séquences porteuses de l'activité biologique de ce dernier. L'invention couvre, de même, les variants nucléotidiques du gène codant pour le C1-inhibiteur, permettant la synthèse d'un produit d'activité similaire au C1-inhibiteur.

Conformément à l'invention, les clones sont constitués par un plasmide dénommé pHCl-INH/1, déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur en date du 25 Juin 1986 sous le N° I-573. Ce plasmide contient la séquence représentée à la Figure 1 annexée.

L'invention couvre également les constructions obtenues en mettant en oeuvre un plasmide d'expression ou des phages de type λ gt11 dans le cas où l'hôte est un procaryote, par exemple E. coli. Dans le cas où l'hôte est une cellule eucaryote animale (cellules Vero par exemple) ou une levure, permettant les modifications post-traductionnelles correspondantes à la protéine naturelle (glycosylation par exemple), on peut utiliser des vecteurs viraux tels que le HSV (herpes), le virus de vaccine, le BPV (bovine papillomavirus) ou l'HPV (human papillomavirus), contenant la séquence nucléotidique codant pour le C1-inhibiteur ou un fragment de celui-ci. Toutes les techniques permettant de transférer les ADN recombinants codant pour tout ou partie

du C1-inhibiteur constitué par un plasmide selon l'invention, à un autre système d'expression (phages, virus, etc...) sont connues de l'homme de l'Art.

5 Selon un mode de réalisation préféré des clones conformes à l'invention, ceux-ci sont caractérisés en ce qu'ils présentent une séquence de nucléotides de leur ADNc inséré qui code pour la phase de lecture ouverte (ORF = open reading frame) de 288 codons qui répond à la formule représentée à la Figure 2 annexée.

10 Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le C1-INH présente une séquence d'acides aminés définie à la Figure 3 annexée, laquelle séquence est déduite du plasmide pHC1-INH/1.

15 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

Pour la mise en oeuvre de l'invention, on procède comme suit :

(a) Préparation d'ARN de foie

20 Des fragments de foie humain prélevé post-mortem sont ajoutés à de l'azote liquide dans un mélangeur et sont réduits en poudre fine. L'ARN est extrait par la technique d'AUFFRAY et ROUGEON (Eur. J. BIOCHEM. 107 (1980) p. 303-324) au chlorure de lithium/urée. L'ARN polyadénylé est isolé par chromatographie sur Poly(U)-Sephadex, l'élution étant réalisée à 42°C avec du formamide à 50%. L'ARN polyadénylé obtenu est dénaturé par de l'hydroxyde de méthylmercure (10 mM) et fractionné par sédimentation sur un gradient isocinetique de 10-33% poids/volume de saccharose.

30 (b) Traduction en milieu acellulaire et immunosélection.

Du lysat de réticulocytes de lapin a été préparé et mis en oeuvre conformément à la technique de PELHAM et JACKSON (EUR. J. BIOCHEM. 67 (1976) p. 247-256) modifiée par JOSI et Al. (IMMUNOL. REVIEWS. 78, (1985) p. 151-183). Les immunosélections ont été réalisées conformément à la méthode de SALERNO et Al. (PROC. NATL. ACAD. Sci. USA, 81, (1984) p. 110-114) avec des anticorps anti-C1r ou anti-C1s fixés à du Protéine A-Sépharose.

(c) Construction d'une banque d'ADNc de foie humain.

De l'ADN double-brin a été synthétisé à partir d'ARN fractionné sur un gradient de saccharose, en utilisant la méthode de GUBLER et HOFFMAN (GENE, 25 (1983) p. 263-269). On homopolymérise une extrémité de l'ADNc et on insère celui-ci dans le vecteur PUC9 décrit par VIEIRA et MESSING (GENE 19 (1982) p. 259-268) à extrémité en poly(dG), en utilisant les méthodes désormais classiques décrites par MANIATIS et Al. dans leur manuel de laboratoire intitulé "Molecular Cloning" paru en 1982 aux Ed. COLD SPRING HARBOR LABORATORY. Des bactéries E. coli 5K (HUBACEK et GLOVER, J. MOL. BIOL., 50, (1979), p. 111-127) ou la souche E. coli HB101 (BOLIVAR et BACKMAN, METHODS ENZYMOL. 68, (1979), p. 245), rendues compétentes (HANAHAN, D. , J. MOL. BIOL., 166 (1983), p. 557-580) sont utilisées pour la réalisation de la banque d'ADNc qui comprend 50000 transformants indépendants et qui est amplifiée environ 500 fois. Après une étape d'amplification, la banque d'ADNc est conservée sous forme d'échantillons congelés en présence de 15 % de glycérol.

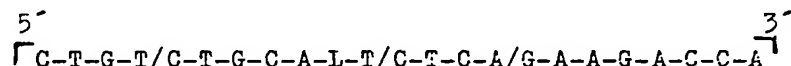
L'ADNc double-brin a été synthétisé, comme indiqué plus haut, par la méthode de GUBLER et Al. et inséré dans le site PstI du vecteur pUC9 comportant une extrémité poly dG.

25 (d) Criblage à l'aide d'une sonde moléculaire

Des aliquots appropriés de la banque d'ADNc amplifiée, représentant au total environ 20000 colonies (éventuellement conservés jusqu'à l'emploi, par congélation rapide dans un bouillon L contenant 15% de glycérol) ont été mis sur gélose à raison de 5000-10000 bactéries ampicilline-résistantes par plaque (NUNC, de 22 x 22 cm) et transférés sur des filtres de Nylon (de marque PALL-BIODYNE) traités comme décrit dans MANIATIS et Al. (Loc. cité).

Le criblage des clones de C1-INH a été réalisé à l'aide d'un mélange de huit icosamères synthétisés par la technique de la phosphoramidite, à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (fourni par APPLIED BIOSYSTEMS, référence 380A) et portant un marquage terminal par la ($-^{32}\text{P}$)ATP et la T4-polynucléotide-kinase (MANIATIS et Al. Loc. cité). Ce mélange marqué couvre les amino-acides LVFEVQQ, qui sont une fraction du peptide séquencé et positionné par SALVESEN et Al. (Loc. cité) au site réactif, à proximité de l'extrémité carboxyle de la protéine. Les oligonucléotides qui le composent ont été isolés dans toute leur longueur, après marquage, à partir d'un gel acrylamide 20%/urée 8M, puis purifiés sur du SEPHADEX G10 (fourni par PHARMACIA).

Le choix pour cette sonde oligonucléotidique, d'une séquence



a été déterminé par la prise en considération de toutes les possibilités de codons pour les trois amino-acides internes (F, E et Q) avec une dégénérescence de deux codons.

Les filtres utilisés pour le criblage ont été pré-hybridés dans un tampon comprenant 90 mM de Tris-ECI (pH 7,5), 6 mM d'EDTA, 0,9 M de NaCl, 0,1% de Na DodSO₄, 400 µg/ml d'ARN de levure, 5x de solution de Denhardt (0,1% Ficoll, 0,1% polyvinylpyrrolidone, 0,1% ESA) et 100 µg/ml d'ADN d'E. coli fragmenté et dénaturé. L'hybridation des filtres a été réalisée à 37°C pendant 8 heures dans un tampon analogue, cependant dépourvu de solution de Denhardt et d'ADN d'E. coli, puis la sonde d'oligonucléotide a été ajoutée à une concentration de 0,2 piconucléotides/ml (4 x 10⁵cpm/ml). Les filtres ont été soigneusement lavés à 37°C dans du tampon contenant 0,9M NaCl, 90 mM citrate de sodium, 0,1% Na DodSO₄.

Après deux séries de criblages, douze colonies positives ont été isolées et leur ADN de plasmide a été analysé par coupure par les endonucléases de restriction PstI ou PvuII.

- 5 Les hybridations effectuées avec la sonde moléculaire synthétique conforme à l'invention ont permis d'identifier dans les clones de C1-INH un petit fragment obtenu par digestion avec PstI d'environ 140 bp qui contient des séquences complémentaires de ladite sonde synthétique.

10 (e) Analyse de la séquence

- On a dressé la carte des sites d'endonucléase de restriction de l'insertion du clone CNCM N° I-573 mentionné précédemment pHCl-INH/1, par marquage terminal et digestions partielles conformément à la méthode de SMITH et BIRNSTEIN (Nucleic Acids Res., 3, (1976) p. 2387-2398) comme cela est
15 montré à la Figure 4 annexée. Les deux brins de chaque fragment PstI ont été sous-clonés dans le vecteur M13/mp8 (décrit par MESSING et VIEIRA, Loc. cité) et séquencés à l'aide de la "méthode au dideoxy" de SANGER et AL. (Proc. Natl. Acad.
20 Sci. USA, 74 (1977) p. 5463-5467). La séquence a été vérifiée par sous-clonage et séquençage des fragments figurant en hâchuré dans la Figure 4.

- La séquence d'acides aminés déduite du plasmide pHCl-INH/1 confirme la présence de 5 résidus VARTL (Valine,
25 Alanine, Arginine, Thréonine, Leucine) restants du peptide séquencé par SALVESEN et AL. (Loc. cité) et non couverts par la sonde synthétique de formule A. A titre d'exemple, on peut se reporter à la Figure 1.

- La séquence d'acides aminés autour du site réactif
30 est hautement spécifique de chaque inhibiteur de sérineprotéase; c'est pourquoi la parfaite concordance de la séquence d'acides aminés obtenue confirme que le plasmide pHCl-INH/1 code pour une partie de l'inhibiteur de C1 humain ou pour une partie d'une protéine étroitement apparentée à
35 cet inhibiteur par sa structure primaire.

(f) Sélection de l'ARNm par hybridation avec de l'ADN de plasmide immobilisé

La preuve que le clone pHCl-INH/1 non seulement correspond bien à une protéine apparentée à Cl-INH mais qu'il s'agit effectivement de celle identifiée par l'antisérum, a été obtenue par l'isolement des ARN messagers correspondants à la séquence portée par le plasmide pHCl-INH/1. De l'ADN de plasmide dénaturé linéarisé (10 µg) fixé sur de la poudre de cellulose a été agité à 50°C pendant 15 heures en présence de 400 µg d'ARN de foie total dissous dans 200 µl d'une solution de formamide à 50% contenant de l'Hepes de sodium (50 mM, pH 7,5), du NaCl (400 mM), de l'EDTA (1 mM) et 0,2% de Li_2SO_4 de sodium. La poudre de cellulose a été lavée à 5 reprises à 40°C par 2 ml de la solution ci-dessus sans formamide et contenant 50 mM de NaCl, et à 5 reprises à 65°C dans cette dernière solution dans laquelle l'Hepes de sodium avait été abaissé à 10 mM et le NaCl augmenté à 150 mM. Après deux lavages supplémentaires dans cette solution sans Li_2SO_4 de Na, l'ARN a été élué par incubation de la poudre de cellulose trois fois dans 100 µl d'eau stérile contenant de l'ARNt de foie de veau (7 µg) et de l'hydroxyde de méthylmercure (10 mM). L'ARN a été traité par du 2-mercaptoéthanol (30 mM) avant de le précipiter par de l'éthanol.

La Figure 5 annexée représente la traduction in vitro d'ARNm sélectionné par hybridation sur le plasmide pHCl-INH/1, obtenue par hybridation d'ARN de foie total (400 µg) à 10 µg d'ADN de plasmide recombinant dénaturé fixé par covalence à de la poudre de cellulose : l'ARN élué est traduit dans un système acellulaire, comme indiqué plus haut. Le fluorogramme, représenté à la Figure 5, d'un gel de PA-SDS à 12,5% représente les polypeptides produits en l'absence d'ARN exogène (colonne 1) et ceux synthétisés par l'ARNm sélectionné à l'aide du plasmide pHCl-INH/1 (colonnes 4 et 5). Alors qu'un quart des produits de traduction de l'ARNm hybride sélectionné est chargé directement sur la colonne 4, les produits restants de cette traduction sont

immunosélectionnés par des anticorps anti-C1-INH (colonne 5). La colonne 3 représente une immunosélection témoin des produits de traduction de l'ARN total, par les mêmes anticorps anti-C1-INH. Comme le montre la Figure 5, les messagers qui s'hybrident au plasmide pHCl-INH/1 dirigent la synthèse de polypeptides qui migrent conjointement avec la protéine précurseur du C1-INH précédemment identifiée, représentée à la colonne 4, et sont reconnus par des anticorps anti-C1-INH (colonne 5). Le plasmide pHCl-INH/1 identifie donc dans le

10 foie humain une seule espèce majeure d'ARNm qui est traduite in vitro en polypeptides de taille homogène, qui présentent une réaction antigénique avec un antisérum C1-INH-spécifique.

(g) Examen des homologues de séquence du C1-INH et de membres de la famille des serpins

15 Une comparaison de la séquence du C1-INH déduite du clone pHCl-INH/1 conforme à l'invention avec les séquences de l' α_1 -antitrypsine (α_1 -PI) et de l'antithrombine III humaine (AT-III), fait apparaître une identité de 27% des acides aminés entre le C1-INH et l' α_1 -PI et une identité un peu

20 moindre entre le C1-INH et l'AT-III (23%).

La constatation d'une parenté de structure entre le C1-INH et l' α_1 -PI permet d'utiliser la structure tridimensionnelle connue de la forme clivée de cette dernière protéine comme modèle de première approximation pour le C1-INH. De

25 même, les informations relatives à la pathologie moléculaire des déficiences d' α_1 -PI qui sont données par la littérature, fournissent également un modèle pour l'étude des formes dysfonctionnelles du C1-INH.

En outre, les sondes moléculaires pour le C1-INH

30 humain sont susceptibles de contribuer dans une mesure importante à la compréhension au niveau moléculaire, des différentes formes d'HAE qui résultent des taux insuffisants de C1-INH dans le sérum, et à l'étude de la régulation du gène normal.

Enfin, les peptides de C1-INH produits par génie génétique devraient permettre le développement de médicaments pour le traitement préventif et le traitement de crise des HAE. A titre indicatif, on peut utiliser la séquence suivante :

SIMEKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTIVLELTET
GVEAAAASAVISVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKKFPVFMGRVYLPRA

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples de mise en oeuvre, sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 - PREPARATION D'ADN RECOMBINANT CODANT POUR LE C1-INH HUMAIN

1ère Etape : Préparation d'ARN de foie

- 20 Des fragments de foie humain prélevé post-mortem ont été ajoutés à de l'azote liquide dans un mélangeur et ont été réduits en poudre fine. L'ARN a été extrait par la méthode en chlorure de lithium/urée (AUFFRAY et ROUGEON, 1980). L'ARN polyadénylé a été isolé par chromatographie
- 25 sur du Poly(U)-Sephadex, conformément aux instructions du Fournisseur (BETHESDA RESEARCH LABORATORY) sauf que l'élution a été effectuée à 42°C avec du formamide à 50%.
- 30 L'ARN polyadénylé a été dénaturé par 10 mM d'hydroxyde de méthylmercure et fractionné par sédimentation sur un gradient isocinétique de saccharose à 10-33% poids/volume.

2ème Etape : Construction d'une banque d'ADNc de foie humain enrichi

De l'ADNc double-brin a été synthétisé à partir de 8 microgrammes d'ARN fractionné par le gradient de saccharose, conformément à la méthode de GUBLER et HOFFMAN (1983). Des procédures standards ont été mises en oeuvre (MANIATIS et Al. 1982) pour obtenir de l'ADNc à extrémités homopolymères et l'insérer dans le vecteur pUC9 à extrémité Poly(dG) (VIERA et MESSING, 1982). Des bactéries E. coli 5K compétentes ont été préparées conformément à HANAHAN (1983) pour réaliser une banque d'ADNc. On peut également utiliser la souche E. coli HB101 (Référence : Methods Enzymol., 1979, 68 Bolivar et al.). La banque d'ADNc, qui comprend 50000 transformants indépendants a été amplifiée environ 500 fois et des aliquots sont rapidement congelés dans du bouillon contenant 15% de glycérol. En vue du criblage, 5000 à 10000 bactéries ampicilline résistantes ont été placées sur des plaques NUNC (de 22 cm x 22 cm). Les colonies ont été transférées sur des filtres de Nylon "Pall-Biodyne" préalablement traités comme décrit par MANIATIS et Al.

3ème Etape : Criblage par des oligonucléotides synthétiques

Un mélange radiomarké de 8 icosamères couvrant les amino-acides LVFEVQQ a été synthétisé par la technique de la phosphoamidite, à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (APPLIED BIOSYSTEMS 380 A); après marquage terminal par la ($-^{32}\text{P}$)ATP et la T4-polynucléotide-kinase, les oligonucléotides ont été isolés à partir d'un gel d'acrylamide 20%/urée 8M. Le criblage a été réalisé avec des filtres préhybridés dans un tampon contenant 90 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM d'EDTA, 0,9 M de NaCl, 0,1% de

- 14 -

- Na DodSO₄, 400 µg/ml d'ARN de levure, de la solution de Denhardt et 100 µg/ml d'ADN d'E. coli fragmenté et dénaturé, puis hybridés pendant 8 heures à 37°C dans le même tampon sans solution de Denhardt ni ADN d'E. coli, avec
- 5 addition de la sonde oligonucléotidique à une concentration de 0,2 picomoles/ml (4×10^5 cpm/ml), après quoi les filtres ont été lavés à fond à 37°C dans du tampon contenant 0,9 M de NaCl, 90 mM de citrate de Na, 0,1% de Na DodSO₄.
- 10 Après deux séries de criblages, douze colonies positives ont été isolées et leur ADN de plasmide analysé par coupure par les endonucléases de restriction PstI ou PvuII. Les hybridations avec le même mélange d'oligonucléotides que ci-dessus ont démontré que dix des douze
- 15 clones probables de C1-INH ont le même petit fragment obtenu par digestion par PstI, de l'ordre de 140 bp, qui contient les séquences complémentaires à la sonde oligonucléotidique conforme à l'invention. Seul le clone
- 20 pHC1-INH/1, qui contient l'insertion la plus longue, a été ensuite analysé pour dresser la carte de ses sites de restriction et pour déterminer sa séquence en nucléotides.

4ème Etape : Sélection de l'ARNm par hybridation par de l'ADN de plasmide immobilisé

- 25 10 µg d'ADN de plasmide dénaturé linéarisé fixé à de la poudre de cellulose ont été agités à 50°C pendant 15 heures en présence de 400 µg d'ARN total de foie dissous dans 200 µl d'une solution de formamide à 50% contenant 50 mM de tampon Hepes de Na, pH 7,5, 400 mM de
- 30 NaCl, 1 mM d'EDTA et 0,2% de Na DodSO₄. La poudre de cellulose a été lavée 5 fois à 40°C, par 2 ml de la même solution toutefois dépourvue de formamide et contenant 50 mM de NaCl, et 5 fois à 65°C dans cette dernière solution ne contenant plus que 10 mM d'Hepes de Na et
- 35 dans laquelle le NaCl avait été porté à 180 mM. Après

deux lavages finaux dans cette solution dépourvue de Na DodSO₄, l'ARN a été élué par incubation de la poudre de cellulose 3 fois dans 100 µl d'eau stérile contenant 7 µg d'ARNt de foie de veau et 10 mM d'hydroxyde de méthylmercure. L'ARN a été traité par 30 mM de 2-mercapto-éthanol préalablement à sa précipitation par de l'éthanol.

EXEMPLE 2 - SYNTHÈSE D'UN POLYPEPTIDE D'ACTIVITÉ SIMILAIRE

AU C1-INH

L'ADN recombinant constitué par le plasmide pHCl-INH/1 selon l'invention permet la production dans E. coli de polypeptides correspondant à une partie du C1-INH et contenant le site réactif. Pour mettre en oeuvre la production de ces polypeptides, on procède aux étapes suivantes.

15 1ère Etape - Transfert de l'insertion du plasmide pHCl-INH/1 ou d'une partie de cette insertion dans un vecteur spécialement conçu pour une production optimale de la protéine C1-INH.

Plusieurs vecteurs de ce type sont disponibles et leur mode d'utilisation est connu. A titre d'exemple, on peut utiliser des vecteurs qui portent un promoteur fort dérivé du bactériophage Lambda (ZETTLMEISSL et Al., Gene 41, (1986) p. 103 ; CROWL et Al., Gene 38, (1985) p. 31).

25 2ème Etape - Dosage quantitatif et qualitatif des peptides C1-INH produits par génie génétique.

Ce dosage se fait par exemple par marquage de cultures bactériennes, contenant les plasmides recombinants, en utilisant des acides aminés radioactifs. Les polypeptides C1-INH sont mis en évidence par immunoprécipitation avec des anticorps anti-C1 inhibiteur, suivie par PA-SDS gel électrophorèse. Des méthodes immunoenzymatiques peuvent également être utilisées.

35 L'activité des peptides contenant le site réactif du C1-INH est déterminée en dosant leur pouvoir de fixer

un des substrats naturels du C1-INH, par exemple le C1s. Dans le cas où l'activité des peptides C1-INH produits dans la bactérie E. coli se révélait trop faible, on mettrait en oeuvre l'expression de la protéine C1-INH dans des cellules eucaryotes (de levures ou de mammi-
fères), comme déjà indiqué précédemment, afin d'assurer les modifications post-traductionnelles de cette protéine.

EXEMPLE 3 - UTILISATION DU C1-INH OBTENU SELON L'INVENTION
POUR LE DOSAGE DANS LE SERUM DU C1-INH NATUREL

Le C1-inhibiteur obtenu selon l'invention est utilisé comme antigène afin d'immuniser des animaux en vue d'obtenir des anticorps polyclonaux ou monoclonaux (préparation d'hybridomes selon la technique de Köhler et Milstein, Nature 1975). Ces anticorps permettent le dosage du C1-inhibiteur naturel.

EXEMPLE 4 - COFFRET DE DIAGNOSTIC

Un mode de réalisation d'un coffret de diagnostic conforme à l'invention peut contenir :

- une gamme standard de C1-inhibiteur,
- solution tampon (borate par exemple),
- des anticorps monoclonaux de souris ou polyclonaux de lapin anti-C1-inhibiteur,
- des anticorps anti-C1-inhibiteur marqués par marqueurs enzymatiques ou fluorescents ou radioactifs, par exemple,
- le (ou les) substrats nécessaires à la révélation du marqueur par exemple de l'activité enzymatique dans le cas d'un ELISA.

EXEMPLE 5 - UTILISATION DU C1-INHIBITEUR POUR LE TRAITEMENT
DES MALADES

Le C1-inhibiteur ou un fragment de celui-ci porteur de l'activité peut être administré aux malades comme médicament. Une solution de C1-inhibiteur ou un fragment de celui-ci est préparé dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Le traitement peut se faire par

voie intraveineuse ou par inhalation avec un aérosol contenant une suspension du produit actif. La dose active est déterminée au cas par cas.

EXEMPLE 6 - DIAGNOSTIC A L'AIDE DE SONDAS D'ADN OU D'ARN

5 La sonde conforme à la présente invention qui est représentée à la Figure 1 et les sondes obtenues contenant cette séquence ou une partie de celle-ci peuvent être utilisées pour détecter les variations structurales des gènes, ou des messagers codant pour des formes défectueuses dudit inhibiteur.

10

Les techniques mises en oeuvre sont :

- prélèvement des cellules des sujets à risque,
 - extraction de l'ADN génomique,
 - coupure de cet ADN par des enzymes de restriction appropriées,
 - 15 - séparation des fragments d'ADN obtenus par électrophorèse et transfert de ces fragments sur une membrane et hybridation avec la sonde ADN ou ARN marquée par un marqueur radioactif ou enzymatique par exemple,
 - 20 - révélation des produits d'hybridation par autoradiographie en cas d'utilisation d'une sonde radioactive.
- Cette technique est connue sous le nom de technique de Southern (Southern blotting).

20

25

L'analyse des résultats par rapport à des témoins normaux et à des témoins malades, de préférence appartenant à la même famille que le sujet testé, permet d'identifier les porteurs de cette maladie génétique.

1) ADN recombinant, caractérisé en ce qu'il code pour au moins une partie de l'inhibiteur C1-INH ou d'une protéine très voisine de ce dernier par sa structure primaire ou son activité biologique.

2) ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il code pour au moins une partie de l'inhibiteur C1-INH humain ou d'une protéine très voisine de ce dernier par sa structure primaire ou son activité biologique.

10 3) ADN recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par un plasmide dénommé pHC1-INH/1, déposé à la CNCM de l'Institut Pasteur en date du 25 Juin 1986 sous le N° I-573.

4) ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente une séquence de nucléotides de son ADNc inséré, qui code pour la phase de lecture ouverte de 288 codons qui répond à la formule ci-après :

20

[illegible]

30

3.

5) Séquence d'acides aminés déduite du plasmide pHCl-INH/1 selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle répond à la formule ci-après :

5 FTTKGVTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASRTL YSSSPRVL SNNSDANL EL INTWVAKNTNN

KISRLLDSL PSDTRL VLLNAIYL SAKWKTTFDPKKTRMEPFHFKNSVIKVPMMNSKKYPV

10 AHFIDQTL KAKVGQL QL SHNL SL VIL VPQNL KHRLEDMEQAL SPSVFKAIMEKLEMSKFQ

PTLLTL PRIKVTTSDQML SIMEKLEFFDFS YDLNL CGLTEDPDL QVSAMQHQT VLELTET

GVEAAAASAI SVARTLL VFEVQOPFL FVLWDOOHKFPVFMGRVYDPRA

15 6) Séquence d'acides aminés contenant le site réactif du Cl-INH, qui s'identifie avec la formule ci-après :

SIMEKLEFFDFS YDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQT VLELTET
GVEAAAASAI SVARTLL VFEVQOPFL FVLWDQQH KFPVFMGRVYDPRA

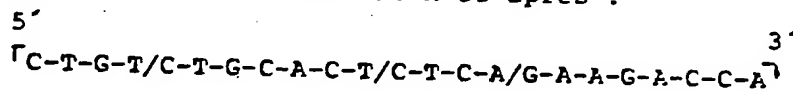
20 7) Sonde pour le diagnostic précoce ou prénatal, au niveau de l'ADN génomique humain, du déficit qui cause la maladie angioedème héréditaire et qui s'identifie avec l'insertion du plasmide pHCl-INH/1 qui répond à la formule selon la revendication 3 ou avec une partie de la même insertion.

25 8) Procédé de préparation d'un clone d'ADN recombinant constitué par la séquence visée à la revendication 4.

9) Procédé de préparation de l'ADN recombinant codant pour le Cl-INH humain ou animal ou une protéine voisine de celui-ci, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes : - une première étape qui consiste à extraire l'ARN total de fragments de foie - une deuxième étape qui consiste à isoler l'ARN polyadénylé, par chromatographie sur du Poly(U)-Sephadex, suivie d'élution à 42°C par du formamide à 50%; - une troisième étape qui consiste à dénaturer l'ARN polyadénylé, par de l'hydroxyde de méthylmercure et à le fractionner par sédimentation par un gradient isocinétique de saccharose de 10 à 33% poids/volu-

- me; - une quatrième étape qui consiste à identifier les fractions d'ARN qui sont enrichies en messagers codant pour le C1-INH; - une cinquième étape qui consiste à synthétiser de l'ADNc double-brin à partir d'une fraction d'ARN enrichie en ARN messagers codant pour le C1-INH, en rendant une extrémité de l'ADNc homopolymère et en l'intégrant dans le vecteur pUC9 à extrémité poly(dG), puis en introduisant les plasmides recombinants formés, dans des bactéries E. coli compétentes; - une sixième étape qui consiste à cribler les bactéries qui possèdent l'information génétique nécessaire à la production du C1-INH et à isoler les clones d'ADNc qui codent pour le C1-INH.

- 10) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le criblage des clones recombinants est réalisé à l'aide d'un mélange marqué de huit icosamères synthétiques couvrant les amino-acides LVFEVQQ, qui sont une partie du peptide séquencé et positionné au site réactif du C1-inhibiteur humain, à proximité de l'extrémité carboxyle de la protéine, lesquels icosamères synthétiques sont constitués par des oligonucléotides de formule A ci-après :



(A)

[illegible]

2/5

P T T K G V T S V S Q I F H S P D L A I R D T F V N A S R T L Y S S S P R V L S
 CTTGACGACCAAGGTGTCACCTCAGTCTCTCAGATCTTCCACAGCCGAGACCTGCCATAGGACACCTTTGTAATGCGCTCTGGACCTGTACAGCAGCCGACGAGTCTTAAG
 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

 N S D A N L E L I N T W V A K N T N K I S R L L D S L P S D T R L V L L N A
 CAACAACAGTACGGCAAGTTGGAGCTGATCAACAGCTGGGTGCGCAAGAACCAACAGATGACCGCGCTGTAGACAGTGTGCGCTGCGATAGCCGCTTGTCTCTCAATCC
 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

 I Y L S A K W K T T P D P K K T R M E P F H F K N S V I K V P H N S K K Y P V
 TATCTACCTGAGTCCCAAGTCCAGACAGCATTTGATCCCAAGAACCAAGATGCGACCTTTTCAGTTCAAAAGTCACTTATAAAGTCCCATGATCAATAGCAGACAGTACCTCT
 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

 A H P I D Q T L K A K V G Q L Q L S H M L S L V I L V P Q N L K H R L E D H E Q
 GCGCATTTGATGACCAAGTTTGAAGCCAGGTGGCGAGCTGCGAGCTCTCCCAATGTCAGTTTGTGATGCTGTACCGCCGAGAACCTEAAACATGCTTTGAAGACATCGAACA
 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480

 A L S P S V F K A I H E K L E H S K F Q P T L L T L P R I K V T T S Q D H L S I
 GGTCTGAGCCCTTCTTTTCAAGCCCATGATGCGAACTGCGAGATGTGCAAGTTCCAGCCCACTGCTCTAACACTACCGCCCATCAAGTACGAGCCGACCATATCTCTCAAT
 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

 H E K L E F F D F S Y D L R L C G L T E D P D L Q V S A H Q H Q T V L E L T E T
 CATGCAAAATTCGAATTCGATTTTCTTATGACCTTAAGCTGTGCGGTGACAGAGCCAGCATTTTCAGGTTTGTGCGATGCGAGCCAGACAGTCTCGCAACTGACAGAGAC
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720

 G V E A A A S A I S V A R T L L V F E V Q Q P F L P V L W D Q Q H K P P V P K
 TCGGTGAGCGGTGAGCTCGGCACTCTGTGCGCGGAGCCCTGCTGTCTTTCAAGTCCAGAGCCCTTCTGCTGTGCGACGAGCAGACAGTTCCTCTCTTAT
 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840

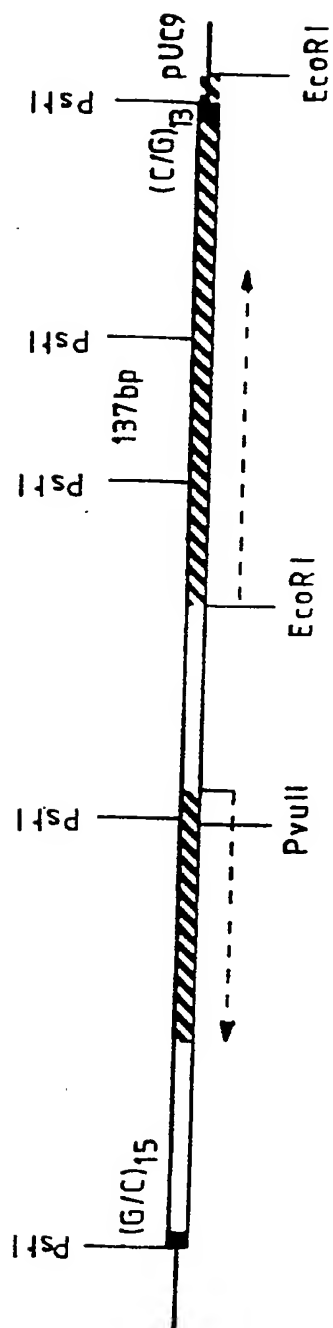
 G R V Y D P R A
 GCGGAGATATGACCCGAGGCC
 850 860

FIG. 2

FIG. 3.

FTTKGYTSVSQIFHSPDLAIRDTFVNASR:TL YSSSPRVL SNNSDANL EL INTWAKNTNM
KISRLLDSLPSDTRL VLLNAIYL SAKWKTTFDPKKTREPFHFKNVYKYPWNSKKYPV
AHFTDQTLKAKVGQLQLSHNL SLVIL VPQML KHRLEDMEQAL SPSVFKATMEKLEMSKFO
PTLLTL PRIKVTTSDQML SIMEKLEFFDFSQYLM CGL TEDPDL QVSAMQHQTVL EL TET
GVEAAAASAI SVARTLL VFEVQOPFL FVLWDQHQKFPVFMGRVYDPR

4 / 5

FIG. 4

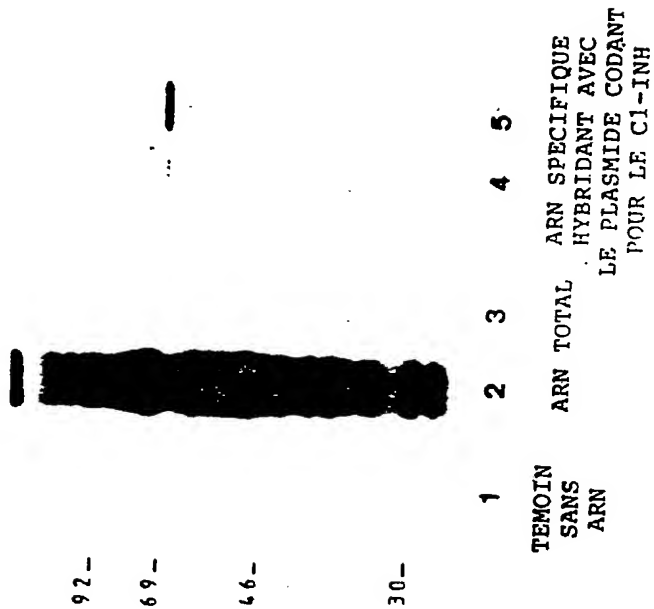


FIG. 5